

大腸癌におけるFibulin 2のスプライシングの変化 とスプライシングバリエーションの機能解析

著者	遠山 慎吾
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18529号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126050

博士論文

大腸癌におけるFibulin 2のスプライシングの変化
とスプライシングバリエーションの機能解析

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科病態学講座 消化器外科学分野

遠山 慎吾

目次

1.	要約	2
2.	研究背景	4
3.	研究目的	8
4.	研究方法	9
5.	研究結果	20
6.	考察	26
7.	結論	33
8.	謝辞	34
9.	文献	35
10.	図説	39
11.	図	45
12.	表	54

1 1. 要約

2 細胞外マトリックスの構成タンパク質をコードする Fibulin 2 (*FBLN2*) 遺伝子に
3 はスプライシングパターンの異なる 3 種類の mRNA がある。大腸癌では、正常部と
4 癌部との間で *FBLN2* のスプライシングパターンが変化することが報告されているが、
5 スプライシングバリエントが大腸癌の発生・進行に果たす役割は不明である。本研究
6 では、大腸癌組織で起こる *FBLN2* のスプライシング変化を定量的に測定し、この変
7 化が大腸癌細胞の増殖と遊走に与える影響を明らかにすることを目的とした。

8 大腸癌組織における *FBLN2* 遺伝子の転写量とそのスプライシングパターンを定
9 量的に調べるために、RNA-sequencing (RNA-seq) データの再解析と RT-qPCR 解析
10 を実施した。*FBLN2* 遺伝子の転写量を解析した結果、大腸組織の正常部と癌部とで、
11 *FBLN2* mRNA の総量に変化は見られなかった。一方、*FBLN2* のスプライシング
12 パターンを解析した結果、正常部ではスプライシングバリエント 1 (バリエント 1)
13 とスプライシングバリエント 2 (バリエント 2) が同程度に発現しているのに対して、
14 癌部ではバリエント 2 の割合が有意に増加していた。この結果は、報告されている
15 *FBLN2* スプライシングパターンの変化と一致していた。これらの結果から、1) 大
16 腸癌組織では正常部組織に比べて *FBLN2* の転写量は変化しないが、スプライシング
17 パターンが変化すること、2) 癌組織では *FBLN2* バリエント 2 が主に発現している

1 こと、が明らかになった。

2 大腸癌組織で FBLN2 を発現する細胞種を同定するために、抗 FBLN2 抗体を用い
3 た免疫組織化学を行った。その結果、抗 FBLN2 抗体の免疫シグナルは大腸の上皮細
4 胞では観察されず、線維芽細胞が存在する粘膜固有層と血管内皮細胞に強く認められ
5 た。この点をさらに調べるために、大腸癌細胞株と直腸由来初代線維芽細胞の FBLN2
6 発現量を解析した結果、FBLN2 の発現量は大腸癌細胞株で低く、線維芽細胞で高か
7 った。すなわち、大腸癌組織で FBLN2 を主に発現している細胞は癌細胞ではなく、
8 線維芽細胞や血管内皮細胞であることが明らかになった。

9 そこで、線維芽細胞により合成される FBLN2 バリエント 1 と 2 が大腸癌細胞の増
10 殖と遊走に与える影響を調べた。バリエント 1 または 2 を安定に発現する線維芽細胞
11 を作製し、FBLN2 を含む条件培地を調製して、大腸癌細胞株を培養した。組織培養
12 皿を用いた二次元培養条件では、バリエント 1 または 2 を含む条件培地はどちらも
13 HT-29 と COLO 205 の増殖を抑制した。しかし、マトリゲルを用いた三次元培養条
14 件ではこの効果は認められなかった。また、バリエント 1 は SW620 の遊走を抑制す
15 る一方、バリエント 2 は DLD-1 の遊走を促進した。以上の結果から、線維芽細胞が
16 合成する FBLN2 は、大腸癌細胞の増殖と遊走に影響を与えて、大腸癌の発生・進行
17 に寄与することが示唆された。

2. 研究背景

大腸癌は、WHO (World Health Organization; 世界保健機関) の IARC (International Agency for Research on Cancer; 国際がん研究機関) による GLOBOCAN database¹⁾によれば、男性で3番目、女性で2番目に罹患者数の多いがんであり、この傾向は、我が国でも同じである (国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」²⁾による)。早期の発見が増えたことや、治療法の開発により死亡率は減少してきている³⁻⁶⁾が、我が国において全がんに占める大腸癌の死亡数は男性で第3位、女性で第1位であり、未だに上位を占めている。大腸癌の死亡数を減らすことは、がん診療に携わる者にとって最重要課題であり、大腸癌の進行機序の解明が求められている。

大腸癌に関して様々な研究がなされているが、その中で細胞外の糖タンパク質をコードする Fibulin 2 (*FBLN2*) 遺伝子のスプライシングパターンが、癌部と正常部で異なることが最近報告されている⁷⁻¹⁰⁾。*FBLN2*は8つのファミリー遺伝子からなる Fibulins ファミリーのメンバーである¹¹⁻¹³⁾。*FBLN2*はバリエント1 (v1、NM_001004019)、バリエント2 (v2、NM_001998) と、バリエント3 (v3、NM_001165035) の3つのスプライシングバリエント (図1a) が知られている¹⁴⁾。v1はv3と転写開始点が異なるが、同じアミノ酸配列を持つタンパク質をコードしている。

1 v2はv1やv3に対して、9番目のエクソンがスプライシングを受けて除去され、翻訳さ
2 れるタンパク質ではカルシウム結合型epidermal growth factor (EGF)-like module
3 が1つ失われる (図1b)。EGF-like moduleは、膜タンパク質の細胞外領域や細胞外タ
4 ンパク質に存在しており、細胞間接着やタンパク質間相互作用に関与していることが
5 報告されている^{15, 16)}。

6 FBLN2は細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) の一種で、ジスルフ
7 イド結合を介してホモ二量体を形成し、さらに、その他の細胞外マトリックスタンパ
8 ク質と結合して網目状構造のタンパク質複合体を形成する^{17, 18)}。この細胞外マトリッ
9 クスの網目構造が細胞接着の足場となり、組織における細胞の増殖や遊走に関与して
10 いる。FBLN2と結合するタンパク質は数多く同定されているが、FBLN2の生物学的
11 な役割は不明な点が多い¹¹⁾。FBLN2は胎生期の心内膜床の形成^{19, 20)}や、思春期・妊
12 娠初期の乳腺の増殖²¹⁾、皮膚の創傷治癒²²⁾に関与しているという報告があるが、
13 *Fbln2*-nullマウスに形態学的な異常は認められていない。このマウスでは*Fibulin 1*
14 (*Fbln1*)が代償的に発現増加していることが確認されており、FBLN2の機能はFBLN1
15 による代償が可能であることを示唆している²³⁾。一方、*Fbln1*-nullマウスは致死であ
16 り、FBLN1の生理的機能はFBLN2では代償できないと言える。

1 FBLN2の癌に関わる研究は散見されるが、FBLN2が腫瘍促進的に働いている癌種
2 ²⁴⁾と、腫瘍抑制的に働いている癌種^{25, 26)}が報告されており、癌種によって異なる機能
3 を示している。ヒト肺腺癌の細胞外マトリックスと肺腺癌モデルマウス由来の癌細胞
4 株では*FBLN2*の発現が高値であることが報告されている²⁴⁾。同論文で、肺腺癌モデ
5 ルマウスの転移巣由来の細胞株の*Fbln2*遺伝子をノックダウンすると、*in vitro*で細胞
6 株の増殖や遊走、浸潤が、また*in vivo*で腫瘍の増大や転移が抑制されることが示され
7 ており、肺腺癌モデルマウスにおいては、FBLN2は腫瘍の増殖・転移に促進的に働
8 いていることが示されている。一方、乳癌においては腫瘍抑制的な効果が報告されて
9 いる^{25, 26)}。乳癌組織や乳癌細胞株においては、FBLN2のタンパク量は正常組織に比
10 べてその発現が減少しており、発現量が低い乳癌細胞株に*FBLN2*を再導入すると細
11 胞増殖能や細胞接着能には影響しないが、浸潤能を低下させる²⁵⁾。また、FBLN2が
12 マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) である
13 ADAMTS-12と相互作用して乳癌細胞株の遊走能や浸潤能を抑制していることが示
14 されている²⁶⁾。進行度の低い乳癌組織においてはFBLN2とADAMTS-12の発現を腫
15 瘍周囲の結合組織内に認めることができるが、進行度の高い乳癌組織においてはこれ
16 らの発現をほとんど認めなかった²⁶⁾。このようにFBLN2は癌種によって異なる機能

を發揮する可能性が示されている。しかし、これらの肺腺癌と乳癌の研究では*FBLN2*のスプライシングバリエーションには着目していない。

最近、RNA-seq データを用いてスプライシングバリエーションの解析が網羅的に行われるようになり、大腸癌、乳癌、肺癌、頭頸部扁平上皮癌および甲状腺癌において正常組織と癌組織で*FBLN2*のスプライシングパターンが変化しているという報告がなされた⁷⁻¹⁰。これらの*FBLN2*のスプライシングパターンの変化を示している報告では、正常部ではv1のmRNA発現割合はv2より高く、癌部ではv2のmRNA発現割合はv1より高い⁷⁻¹⁰。この結果より*FBLN2* pre-mRNAの選択的スプライシングは癌の発生・進行と関係があることが示唆される。しかし癌における*FBLN2*スプライシングバリエーションの機能的役割はほとんど分かっていない。上咽頭癌において、v1は正常部でも癌部でもほとんど発現していないが、v2は正常部で発現が高く、癌部で発現が低下しており、v2を上咽頭癌細胞株に再導入すると細胞増殖、遊走、浸潤、血管新生が抑制されることが示されている²⁷。しかし、癌における*FBLN2*のスプライシングバリエーションの機能を比較検討した研究はなく、大腸癌における*FBLN2*の関与についても未だに解明されていない。本研究では異なるスプライシングバリエーションが大腸癌細胞株に与える機能的役割を探索した。

1 **3. 研究目的**

- 2 大腸正常組織と大腸癌組織における *FBLN2* のスプライシング変化を定量的に検
- 3 証し、*FBLN2* スプライシングバリエントが大腸癌細胞の増殖と遊走に与える影響を
- 4 明らかにすることを目的とした。

4. 研究方法

I. 組織標本の作製とtotal RNA抽出

本研究は本学医学系研究科倫理委員会よりヒトゲノム研究として承認を受けた。東北大学病院総合外科で手術を行なった7例の大腸癌患者の手術検体から、癌組織と正常組織をそれぞれ5 mm四方で採取した（患者1-患者7、表1）。組織は採取後すぐに液体窒素に入れて凍結し、-80°Cで保存した。さらに4例の直腸癌患者と1例の胃癌患者の手術検体より線維芽細胞を単離した（患者8-患者12、表1）。術後病理診断の結果から、UICC (Union for International Cancer Control; 国際対癌連合) の定めるTNM Classification of Malignant Tumours (Seventh edition)²⁸⁾ に従い病期を決定した（表1）。なお、Patient 5は合併症に潰瘍性大腸炎を示したが、腫瘍形態などの所見から通常の直腸癌と判断し、直腸癌に準じた治療が行われた。Patient 5の標本でも非腫瘍部に炎症所見は認めなかった。

組織からのtotal RNA抽出にはSV Total RNA Isolation System (Promega、Madison、WI、USA) を用いた。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies、Santa Clara、CA、USA) を用いて抽出したtotal RNAのRIN (RNA Integrity Number) 値を測定し、total RNAの品質を評価した（表1）。

1 II. 細胞培養とRNA およびタンパク質の抽出

2 SW620、HT-29、COLO 205はAmerican Type Culture Collection (Manassas、
3 VA、USA) より、DLD-1、HCT-8は東北大学加齢医学研究所 (仙台、日本) より購
4 入した。線維芽細胞はoutgrowth法^{29, 30)}により単離した(患者8-患者12、表1)。手術検
5 体から切除した新鮮な組織片を細切し、10% v/v FCS (fetal calf serum; ウシ胎仔血
6 清、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) と1% v/v ペニシリン-スト
7 レプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含むDulbecco's Modified Eagle's
8 Medium (DMEM、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)で培養し、遊出してきた
9 線維芽細胞を回収した。SW620と初代線維芽細胞はDMEM (Sigma-Aldrich)、HT29
10 は McCoy's5A (Thermo Fisher Scientific) 、COLO 205 とDLD-1、HCT-8は
11 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) にて37℃、5%二酸化炭素の環境で培養した。それぞれ
12 の培地には10% v/v FCS (Thermo Fisher Scientific)、1% v/v ペニシリン-ストレプト
13 マイシン (Thermo Fisher Scientific)、2 mM L-グルタミン (Thermo Fisher
14 Scientific)、1% v/v MEM-NEAA (non-essential amino acid; 非必須アミノ酸、
15 Thermo Fisher Scientific)、1% v/v ピルビン酸ナトリウム (Thermo Fisher
16 Scientific)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (Wako、大阪、日本) を添加した。
17 培養細胞からのRNA抽出は、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用い

1 て、添付文書に沿って行なった。

2 タンパク質抽出は400 μ M Na_3VO_4 (sodium orthovanadate; オルトバナジン酸ナ
3 トリウム、Wako)、400 μ M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; エチレンジア
4 ミン四酢酸、DOJINDO、熊本、日本)、10 mM NaF (sodium fluoride; フッ化ナト
5 リウム、Wako)、10 mM ピロリン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich)、300 mM NaCl
6 (Sigma-Aldrich)、50 mM Tris-HCl (pH 7.4、Wako)、0.5% v/v Triton X-100 (Wako)、
7 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; フッ化フェニルメチルスルホニル、
8 Wako)、2.5 μ g/ml aprotinin (Sigma-Aldrich)、2.5 μ g/ml leupeptin (Sigma-Aldrich)
9 から成るlysis bufferを細胞に加えて懸濁し、氷上で15分間静置した後に、15,000 rpm、
10 4°Cで10分間遠心して上清を回収した。タンパク質定量はPierce 660 nm Protein
11 Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてマイクロプレートリーダー
12 (iMark; Bio-Rad、Hercules、CA、USA) で行なった。

13

14 III. *FBLN2*を安定に発現する不死化線維芽細胞の作製と条件培地の作製

15 患者12 (表1) より単離した初代線維芽細胞にヒトtelomerase reverse
16 transcriptase (TERT) をコードするレンチウイルス (pCSIIpuro) を感染させて、
17 G418 (Sigma-Aldrich)を用いて薬剤選択を行ない、不死化した。この不死化線維芽細

1 胞では内在性*FBLN2*の発現は低く、ウェスタンブロッティングで非常に弱いシグナ
2 ルしか認めなかった。この不死化線維芽細胞に3×FLAGを融合させた*FBLN2v1*また
3 は*FBLN2v2*をコードするレンチウイルス (pCSIIpuro-3×FLAG) を感染させ、ピュ
4 ーロマイシンを用いて薬剤選択を行ない、*FBLN2v1/v2*を安定に発現する不死化線維
5 芽細胞を作製した。

6 *FBLN2v1/v2*を安定に発現する不死化線維芽細胞を15 cm培養皿でフェノールレッ
7 ド不含DMEM培地 (Sigma-Aldrich) を用いて3日間培養し、培養上清を0.45 μmフィ
8 ルター (Sartorius, Goettingen, Germany) を用いて浮遊細胞を除去して回収した。
9 タンパク質定量はPierce 660nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific)
10 を用いてマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で行ない、タンパク質濃度が2.0
11 mg/mlになるようにPBSで調整し、v1またはv2を含む条件培地を作製した。陰性対照
12 として*FBLN2*発現ベクターを導入していない親株の不死化線維芽細胞を用いて、同
13 様の方法で対照培地を作製した。

14

15 IV. RNA-sequencing (RNA-seq)

16 RNA-seqデータの再解析では、KobayashiらのデータセットとKimらのデータセッ
17 トを用いた。Kobayashiらのデータセット(DRA004011)³¹⁾は、以前に我々の研究室で

解析を実施したもので、東北大学病院総合外科で手術を行なった3例の大腸癌患者
(患者1-患者3、表1)の正常部と癌部から抽出したRNAを使用した。Kimらのデータセ
ット (GSE50760)³²⁾は、韓国で手術を行った18例の大腸癌患者のRNAを使用してい
た。

V. RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction)

組織または細胞から抽出したtotal RNAから、PrimeScript RT Reagent Kit
(Takara Bio、滋賀、日本) を用いてcDNA (complementary DNA; 相補的DNA) を
合成した。FBLN2 バリエント1と2の違いはエクソン9の有無である (図1a)。
RT-qPCRのプライマーはバリエントを特異的に認識できるように、リバープライ
マーをv1はエクソン9に、v2はエクソン8とエクソン10をまたぐように設定した (図
1c)。反応にはFast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、
StepOnePlus Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) でduplicateにて
検出した。RT-qPCRのデータ解析には $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用い、内在性遺伝子として
glucuronidase beta (*GUSB*) を用いて補正を行なった。プライマーの配列情報は以下
の通りである。

1 FBLN2v1 (forward): 5'- AGCCCAATACCTGCAAAGAC-3'

2 FBLN2v1 (reverse): 5'- GGATATAGCCATCGGCACAG-3'

3 FBLN2v2 (forward): 5'- ATTTTCCCAGGTGGCCTCTA-3'

4 FBLN2v2 (reverse): 5'- CACACTCGTTGATGTCTTC-3'

5 GUSB (forward): 5'- TGCGTAGGGACAAGAACCAC-3'

6 GUSB (reverse): 5'- GGGAGGGGTCCAAGGATTTG-3'

7 また、RT-qPCRの条件は以下の通りである。

8 FBLN2v1、GUSB: 95°C 20 秒

9 (95°C 3 秒、60°C 30 秒) x 40 サイクル

10 FBLN2v2 : 95°C 20 秒

11 (95°C 3 秒、64°C 30 秒) x 40 サイクル

12

13 VI. 免疫組織化学

14 パラフィン切片をキシレンで洗浄し、さらにエタノールで洗浄後に再水和させた。

15 次にクエン酸バッファー (1.8 mM クエン酸 + 8.2 mM クエン酸三ナトリウム) に

16 浸し、120°C、20分間オートクレーブ処理を行ない、抗原賦活化した後、0.1 M グリ

17 シン/PBSに5分間、2回浸した。0.3%過酸化水素水に30分間浸して、内在性ペルオキ

1 シダーゼを不活化させた。ブロッキングを行なった後、一次抗体として200倍希釈し
2 た抗FBLN2抗体 (HPA001934, Sigma-Aldrich) を200 μ l プレパラートに滴下して、
3 4°Cで一晩反応させた。翌日にTBSTで洗浄後、VECTASTAIN *Elite* ABC Kit
4 (Funakoshi、東京、日本) を使用し、ビオチン標識した二次抗体液を滴下して、室温
5 で30分間反応させた。TBSTで洗浄後、アビジン-ビオチン標識したペルオキシダーゼ
6 複合体を滴下し、室温で30分間反応させた。TBST で洗浄後、Liquid DAB +
7 Substrate Chromogen System (3,3'-Diaminobenzidine; 3,3'-ジアミノベンジジン、
8 Dako、Santa Clara、CA、USA) を用いて発色させ、ヘマトキシリンで対比染色し
9 た。エタノールで脱水し、キシレンで透徹した後に封入を行ない、顕微鏡 (BZ-9000;
10 KEYENCE、大阪、日本) で観察した。

11

12 VII. ウェスタンブロッティング

13 組織や細胞から抽出したタンパク質に 2 \times SDS (sodium dodecyl sulfate; ドデシ
14 ル硫酸ナトリウム) sample buffer を加えて、7% (FBLN2) または 12% (β -actin) の
15 ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行なった。泳動終了後に 24 V で 1 時間かけ
16 てイモビロン-P トランスファーメンブレン (Millipore、Burlington、MA、USA) に
17 転写した。メンブレンを 0.5%スキムミルクで 30 分間振盪し、ブロッキングを行なっ

1 た後、一次抗体として 8,000 倍希釈した抗 FBLN2 抗体 (HPA001934、
2 Sigma-Aldrich) と 20,000 倍希釈した抗 β -actin 抗体 (3700S、Cell Signaling
3 Technology、Danvers、MA、USA) を用いて 4℃で一晩反応させた。翌日に、洗浄
4 後に二次抗体として FBLN2 は Anti-Rabbit IgG-HRP (W401B、Promega) 、 β -actin
5 は Anti-Mouse IgG-HRP (W402B、Promega) を用いて室温で 1 時間反応させた。反
6 応後に洗浄し、SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Solution (Thermo Fisher
7 Scientific) または Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて化学発光反
8 応を行ない、ChemiDoc Touch イメージングシステム (Bio-Rad) を用いてシグナル
9 検出を行なった。2 × SDS sample buffer の組成は以下の通りである。

10 100 mM Tris-HCl (Wako、pH 6.8)、4% w/v SDS (Wako)、20% v/v Glycerol
11 (Wako)、BPB (Bromophenol Blue; ブロモフェノールブルー、Sigma-Aldrich)、
12 2.5% v/v 2-ME (Mercaptoethanol; メルカプトエタノール、MP Biomedicals、
13 Santa Ana、CA、USA)

14

15 VIII. 増殖アッセイ

16 大腸癌細胞株をv1条件培地、v2条件培地または対照培地に懸濁し、HT-29は1,000
17 細胞/ウェル、COLO 205とSW620は500細胞/ウェルとなるように96ウェルプレート

1 に播種し、7日間培養した。培地は3日毎に交換した。培養1、3、5、7日目にそれぞれ
2 れ培地を吸引し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) 10 μ lと培地100 μ lを混合し、細胞に
3 加えて2時間培養した。バックグラウンドとして細胞を播種していないウェルにも同
4 様にCell Counting Kit-8含有培地を加えた。その後、マイクロプレートリーダー
5 (Bio-Rad) で450 nmの吸光度を測定し、検体の測定値からバックグラウンドの測定
6 値を引いて検体に対する値とした。

7

8 IX. マトリゲル増殖アッセイ

9 マトリゲル (Corning, Corning, NY, USA) にv1条件培地、v2条件培地または対
10 照培地を加え、33%マトリゲル溶液を調製し、96ウェル平底プレートに加えて、37℃
11 で1時間静置してゲル化させた。培地に大腸癌細胞株を懸濁し、2,000細胞/ウェルと
12 なるように調整し、ゲル化させたマトリゲルの上に加えて、7日間培養した。培地交
13 換は3日毎に行なった。7日目にCKX41倒立顕微鏡 (Olympus、東京、日本) で1ウェ
14 ルあたり4視野撮影し、1視野あたり5個のコロニーの面積をImageJ software (Ver.
15 1.51m9、U. S. National Institutes of Health、Bethesda、MD、USA) を用いて計
16 算した。

17

1 X. 遊走アッセイ

2 大腸癌細胞株を培地で懸濁し、 1.5×10^6 細胞/ウェルとなるように6ウェルプレート
3 に播種し、1日間培養した。コンフルエントになっていることを確認して、滅菌した
4 1,000 μ l チップを用いて垂直にスクラッチをし、創傷部を作製した。スクラッチは1
5 ウェルあたり3箇所で行なった。PBSで洗浄し、浮遊細胞や沈殿細胞を除去した。v1
6 条件培地、v2条件培地または対照培地を加えた後、CKX41倒立顕微鏡 (Olympus) で
7 0日目の写真を撮影した。その後2日または3日間培養し、写真を撮影した。ImageJ
8 software (Ver. 1.51m9、U. S. National Institutes of Health) を用いて創傷部の面積
9 を測定し、以下の式により遊走率を計算した。

10
$$\text{(0日目の創傷面積} - \text{2日目または3日目の創傷面積)} / \text{0日目の創傷面積} \times 100$$

11

12 XI. 統計学的解析

13 実験は複数回施行し、結果は全て平均値と標準偏差をグラフで示した。RNA-seq
14 と RT-qPCR の解析には Wilcoxon signed rank test を用いた。増殖アッセイには two
15 way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test、遊走アッセイとマトリゲル増殖ア
16 ッセイには Tukey-Kramer test を用いた。統計学的検定には JMP (ver.14、SAS、
17 Cary、NC、USA) を用いた。いずれの検定結果についても、 $p < 0.05$ を統計学的に

- 1 有意であるとした。

1 5. 研究結果

2 I. 正常大腸組織と大腸癌組織における *FBLN2* 遺伝子の選択的スプライシ

3 グ

4 大腸癌における *FBLN2* スプライシングバリエントの発現について、以前に行った

5 RNA-seq解析データ(DRA004011)³¹⁾を再解析することにより調べた。このデータセ

6 ットは、東北大学病院総合外科で手術を行い、我々の研究室でABCトランスポーター

7 の発現解析に用いたものである³¹⁾。*FBLN2* スプライスバリエントの発現量は、正常

8 部ではv1とv2が同程度に発現していたのに対して、癌部ではv2の発現量が高かった

9 (図2a)。この結果は、以前の報告と同じ結果であった^{9, 10)}。我々のデータセットでは、

10 正常部でも癌部でもv3の発現は認めなかった。

11 さらに、18人の大腸癌患者の検体をRNA-seqにより解析したKimらのデータセッ

12 ト (GSE50760)³²⁾を用いて、*FBLN2* mRNAの総量とそのスプライシングパターンを

13 定量的に調べた。その結果、*FBLN2* mRNAの総量は、正常部と癌部とで変化を認め

14 なかった (図2b)。一方、スプライシングパターンに関しては、v1の発現量は正常部

15 で有意に高かったが (図2c)、v2の発現量は正常部と癌部とで差を認めなかった (図

16 2d)。*FBLN2* mRNAの総量を100%として各スプライシングバリエントの発現量を割

合で示すと、正常部ではv1が、癌部ではv2の割合が有意に高かった（図2e-f）。このデータセットでもv3の発現は認めなかった。

RNA-seqの解析結果をRT-qPCRにより検証するために、我々のRNA-seqのデータセットの患者3例に加え、東北大学病院総合外科で手術を行なった大腸癌患者をさらに4例追加し、*FBLN2* mRNAの総量と2つのスプライシングバリエントを特異的に検出、解析した。図1cで示すように、リバープライマーをv1ではエクソン9に、v2ではエクソン8とエクソン10のジャンクションに設定することで、各バリエントを特異的に検出した。qPCRの結果、*FBLN2* mRNAの総量に差を認めなかった（図3a）。スプライシングパターンに関しては、v1の発現量は正常部で有意に高かったが（図3b）、v2の発現量に有意な差は認めなかった（図3c）。図2と同様に*FBLN2* mRNAの総量を100%として各スプライシングバリエントの発現を割合で示すと、正常部ではv1の割合が、癌部ではv2の割合が有意に高かった（図3d-e）。これらの結果から、1）大腸癌組織では正常部組織に比べて*FBLN2* mRNAの総量は変化しないが、スプライシングパターンが変化すること、2）大腸癌組織ではv2の割合が有意に上昇していることが判明した。

II. *FBLN2*の大腸組織における発現部位

大腸組織においてFBLN2の発現部位を同定するために、RNA-seqと同一の患者2例(患者1、患者2、表1)の組織標本を用いて免疫組織化学を行なった(図4a-4f)。FBLN2の発現は主に粘膜下層の結合組織や血管内皮といった間質で認め、粘膜上皮にはほとんど認めなかった。正常部では粘膜下層の線維芽細胞でFBLN2の発現をほとんど認めなかった(図3b、3e)が、癌部では発現が強くなっていた(図3c、3f)。

以前の報告で、ヒトの胎児線維芽細胞と皮膚由来の線維芽細胞でFBLN2が発現していることが示されている³³⁾。大腸においてFBLN2は、大腸上皮や間質の線維芽細胞などいずれの細胞が発現しているのかを調べるために、大腸癌細胞株と、直腸癌患者(患者8-11、表1)の手術検体より単離した初代線維芽細胞からRNAとタンパク質を調製し、FBLN2の発現をRT-qPCRとウエスタンブロッティングで確認した。大腸癌細胞株はSW620、HT-29、COLO 205、HCT-15を用いた。RT-qPCR、ウエスタンブロッティングいずれにおいても大腸癌細胞株ではFBLN2の発現を認めず、初代線維芽細胞では発現を認めた(図4g、4h)。以上の結果よりFBLN2は大腸組織においては主に間質の線維芽細胞で発現していることが判明した。

III. 二次元培養下における細胞外FBLN2による大腸癌細胞株の増殖抑制

1 FBLN2は細胞外マトリックスを構成するタンパク質の一つである。FBLN2のスプ
2 ライシングバリエーションの細胞外マトリックスでの役割を調べるために、C末端側に
3 3xFLAG標識したFBLN2v1またはv2を安定に発現する不死化線維芽細胞を作製した。
4 v1、v2いずれも線維芽細胞の培養上清に分泌されていることをウエスタンブロッティ
5 ングで確認した（図5a）。なお、3xFLAG標識した外来性FBLN2を発現しない不死化
6 線維芽細胞では、FBLN2の発現は認められない。

7 FBLN2が大腸癌細胞株の増殖に与える影響を調べるために、条件培地を用いて増
8 殖アッセイを行なった（図5b）。HT-29、COLO 205、SW620を条件培地または対照
9 培地で7日間培養し、Cell Counting Kit-8を用いて大腸癌細胞株数を測定した。
10 HT-29とCOLO 205ではv1、v2いずれも陰性対照に比べて細胞増殖が抑制されたが、
11 v1とv2の間では増殖に対する有意な差は認めなかった（図5c、5d）。SW620ではいず
12 れの群でも増殖に有意な差を認めなかった（図5e）。これらの結果より細胞外FBLN2
13 は二次元培養下で細胞株依存的に増殖を抑制していることが示された。

14

15 IV. 三次元培養下における大腸癌細胞株の増殖に対して細胞外FBLN2が与え
16 る影響

FBLN2は細胞外マトリックスを構成するタンパク質の一つで、他の細胞外マトリックスタンパク質と結合して働くことが知られている。マトリゲル (Corning) は laminin や collagen といった細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出された可溶性製剤であり、室温でゲル化する。このマトリゲルにFBLN2v1 またはv2 タンパク質を添加し増殖能に対する影響を調べた (図6a)^{34, 35)}。マトリゲル濃度が33%となるように条件培地または対照培地とマトリゲルを混合し、37°Cでゲル化させた後、ゲル上にHT-29、COLO 205、SW620を播種した。7日間培養した後、コロニーの面積を測定することで、増殖能を比較した。しかし、いずれの細胞株においても陰性対照とv1、v2間に有意な差は認めなかった (図6b-6d)。FBLN2は三次元培養下では増殖能に影響を与えないことが示された。

V. 大腸癌細胞株における細胞外FBLN2v1による遊走能抑制とv2による遊走能促進

次に、FBLN2スプライシングバリエントが大腸癌の遊走に与える影響を調べるために、条件培地を用いて遊走アッセイを行なった (図7a)。SW620、DLD-1、COLO 205、HCT-8とHT-29を通常通り1日間培養し、0日目でスクラッチを行なった後に、条件培

- 1 地と対照培地で2~3日間培養し、創傷部の面積を測定して、細胞の遊走率を計算した。
- 2 SW620ではv2や陰性対照と比較してv1では遊走能の抑制が見られた（図7b、7c）。対
- 3 照的にDLD-1ではv1や陰性対照と比較してv2で遊走能の促進が見られた（図7d、7e）。
- 4 COLO 205とHCT-8ではv1と比較してv2で遊走能の促進を認めたが、陰性対照とは有
- 5 意な差は認めなかった（図7f、7g）。HT-29では全ての群間で有意な差は認めなかった
- 6 （図7h）。これらの結果よりv2はv1と比較して大腸癌細胞株の遊走を促進することが示
- 7 され、細胞株により効果の差はあるが、v1は遊走能を抑制的に、v2は遊走能を促進的
- 8 に作用することが示唆された。

1 6. 考察

2 I.大腸癌における *FBLN2* の選択的スプライシング

3 以前から正常大腸組織と大腸癌組織では *FBLN2* の選択的スプライシングパターン
4 が大きく変化することが報告されている⁷⁻¹⁰。それらの報告では、全 *FBLN2* mRNA
5 量に占める v1 と v2 の mRNA 量の割合を計算し、v2 は正常部ではその割合が低く、
6 癌部では高くなっていることを示している。今回私は RNA-seq と RT-qPCR を用い
7 て、これらの報告の結果を再確認した。

8 また、正常部と癌部で *FBLN2* の転写活性が変化している可能性も考えられたため、
9 *FBLN2* スプライシングバリエントの発現の割合だけでなく、発現の量も測定した。
10 癌部と比較すると、正常部では v1 の mRNA 発現量は増加しているものの、v1 と v2
11 を合計した *FBLN2* の全発現量に変化は認めなかった。この結果は、大腸癌組織にお
12 いて *FBLN2* 転写活性は変化せず、v1 から v2 への選択的スプライシングの変化が起
13 きていると考えられた (図 8a)。v2 の発現量は正常部と癌部で有意な差は認めなかつ
14 た。これは *FBLN2* mRNA 量が、サンプル間で大きくばらついたことが原因である
15 と考えられる。大腸組織では *FBLN2* は、上皮細胞ではなく間質の線維芽細胞で発現
16 している事が免疫組織化学や細胞株を用いた実験から明らかとなった。そのため
17 *FBLN2* mRNA 量のサンプル間のばらつきは検体中に含まれる間質の線維芽細胞の

1 量を反映していると考えられる。線維芽細胞の *FBLN2* 発現量を比較するためにはレ
2 ーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって間質部分のみをサンプリング
3 して RT-qPCR を行なうことが必要であり、組織検体全体を用いるよりも線維芽細胞
4 における *FBLN2* の発現量とスプライシングの変化をより感度高く検出する事が可能
5 となる³⁶⁾。今後、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いて、間質選択
6 的な RT-qPCR を行い、より正確な *FBLN2* のスプライシング変化を検証したい。

7 大腸癌において *FBLN2* の選択的スプライシングがどのように制御されているのか
8 はまだ不明である。Danan-Gotthold らは *FBLN2* のスプライシングパターンと
9 *FBLN2* の全発現量との関係を検討している⁹⁾。大腸癌を含め、いくつかの癌種では
10 スプライシングバリエーションの割合は *FBLN2* の全発現量と有意な関係があったが、有
11 意な関連を認めない癌種も存在した。本研究でも Kim らの RNA-seq のデータセット
12 で検討したところ、有意な関連を認めたが、一方、今回の臨床検体を用いて行なった
13 RT-qPCR では有意な関連を認めなかった。

14 選択的スプライシングは RNA 結合スプライシング因子によって制御されている。
15 Danan-Gotthold らの報告で、RBFOX2 を含めたスプライシング因子の発現量は正
16 常大腸組織と比較して大腸癌組織では減少していることが分かっている⁹⁾。
17 RBFOX2 は選択的スプライシングを受けるエクソンのすぐ下流のイントロンにある

UGCAUG という、種間でよく保存されている RNA 配列と結合し、成熟 mRNA への標的エクソンの取り込みを促進する³⁷⁾。*FBLN2* の pre-mRNA は v2 でスプライシングにより除去されるエクソン 9 の下流のイントロン 9 に UGCAUG 配列を持っているので、大腸癌では *RBFOX2* の発現が減少すると、*FBLN2* のエクソン 9 の取り込みを抑制する可能性が考えられた (図 8b)。実際にマウスの動脈の内皮細胞特異的に *Rbfox2* をノックアウトすると、*Fbln2* のエクソン 9 のスプライシング取り込みが抑制されることが報告されており、上記仮説を支持する結果である³⁸⁾。しかし、Kim らの RNA-seq のデータセットで検討したところ、このデータセットでは *RBFOX2* の発現と *FBLN2* のバリエーションの発現割合に有意な関連は認められなかった。*RBFOX2* の他にも癌関連スプライシング因子の報告はあり⁹⁾、大腸癌における *FBLN2* の選択的スプライシングに関わっているスプライシング因子の検索は今後の課題としたい。

II. 大腸癌における *FBLN2* スプライシングバリエーションの機能的役割

FBLN2 は細胞外マトリックスを構成するタンパク質であり、laminin や fibronectin を含む様々な細胞外マトリックスタンパク質と結合する^{11, 18)}。*FBLN2v2* はエクソン 9 がスプライスアウトされるため、*FBLN2v1* に比べてカルシウム結合型

1 EGF-like module が 1 つ少ない。この EGF-like module は様々な細胞外マトリック
2 スタンパク質に存在し、細胞外マトリックスタンパク質間の相互作用に関与している
3 ¹⁶⁾。FBLN2v2 で EGF-like module が 1 つ減ることで、FBLN2v1 と比較して細胞外
4 マトリックスタンパク質との相互作用が変化し、FBLN2 結合タンパク質が異なっ
5 くる可能性が考えられた。

6 今回の研究で、HT-29 と COLO 205 においては、FBLN2 は、v1 と v2 いずれも二
7 次元培養条件下では細胞増殖を抑制することが判明した。その機序は不明であるが、
8 一つの可能性として細胞外 FBLN2 タンパク質は、fibronectin と結合する事が知られ
9 ているので、fibronectin が誘導する integrin シグナルを FBLN2 が抑制することで
10 癌細胞の増殖を抑制していることが考えられる。Integrin は細胞表面の膜貫通タンパ
11 ク質で、fibronectin などの細胞外マトリックスタンパク質のレセプターとして働く。
12 Fibronectin は癌細胞の細胞膜にある integrin と結合し、PI3K-Akt 経路や MAPK 経
13 路を介して細胞周期を G1 期から S 期へと進める ³⁹⁻⁴¹⁾。細胞外 FBLN2 は fibronectin
14 と結合して、fibronectin と integrin の結合を阻害することでこれらの経路を抑制す
15 る可能性が考えられる(図 9a)。

16 また、細胞株依存的に増殖能の抑制を認めたが、この結果は細胞株の遺伝子変異が
17 影響している可能性が考えられた。HT-29 と COLO 205 では FBLN2 を含む培養上

1 清による増殖抑制効果を認め、SW620 ではその効果を認めなかった。HT-29 と COLO
2 205 は *BRAF* 遺伝子に変異をもつが、SW620 は変異をもたない。*BRAF* 遺伝子変異
3 は MAPK 経路を活性化し、細胞増殖を促進する。Integrin にリガンドが結合すると
4 非受容体型チロシンキナーゼ Focal adhesion kinase (FAK) がリン酸化し、MAPK
5 経路の活性化が起きる⁴²⁾。この FAK のリン酸化を阻害すると *KRAS* 遺伝子変異を持
6 つ肺癌細胞株の増殖が抑制される⁴³⁾。同じように *BRAF* 遺伝子変異を持つ HT-29 と
7 COLO 205 でも、FBLN2 によって integrin シグナルが阻害され、FAK のリン酸化
8 が抑制されることで細胞増殖が抑制されている可能性が考えられる。

9 遊走アッセイでは SW620 においては v1 による遊走能の抑制を、DLD-1 において
10 は v2 による遊走能の促進を認めた。Integrin シグナルは、Rho-ROCK 経路を介して
11 遊走能にも影響する (図 9b)^{39, 41, 44, 45)}。以前の報告で、細胞外マトリックスの硬さが
12 Rho-ROCK 経路を介して細胞の遊走に影響することが知られている⁴⁶⁾。FBLN2v2
13 は癌微小環境における細胞外マトリックスの硬さを制御することで癌細胞の遊走に
14 最適な環境を作り出している可能性が考えられる (図 9b)。また、v1 と v2 で細胞外
15 プロテアーゼ MMP に対する感受性が異なっている可能性も考えられる (図 9c)。
16 MMP は細胞外マトリックスをリモデリングすることで癌細胞の遊走を促進している
17 ⁴⁷⁾。またいくつかの細胞外プロテアーゼは FBLN2 を分解することが報告されている

1 48)。MMP に対する感受性が v1 と v2 で異なることで、v2 はより癌細胞の遊走に有
2 利なようにリモデリングされている可能性が考えられる。

3 マトリゲル増殖アッセイでは二次元培養条件下で見られた細胞株依存的な FBLN2
4 の増殖抑制効果を認めなかった。これは、より生体に近い環境下では FBLN2 は細胞
5 増殖には影響を与えていないことが示唆される。このような差が生じる原因として、
6 マトリゲル内には二次元培養条件下に比べ、細胞周囲に fibronectin を含む細胞外マ
7 トリックスが大量に存在し、FBLN2 の fibronectin と integrin の結合阻害効果の影
8 響が相対的に弱くなる可能性が考えられた。in vivo での実験を行うことで、FBLN2
9 が大腸癌の増殖能に与える影響をより正しく評価できると考えられる。

10 今回の研究で、正常大腸組織と大腸癌組織では間質の線維芽細胞で FBLN2 が発現
11 しており、癌部では v2 の発現の割合が高いことが示された。v1 と v2 を合計した
12 FBLN2 の全発現量は正常部と癌部とで変化がないことから、大腸癌の発生・進行の
13 過程で FBLN2 の v1 から v2 へのスプライシング変化が起こっていることが考えられ
14 た。生体環境下では FBLN2 は増殖能には影響を与えないが、遊走能に関しては、v1
15 は遊走能を抑制し、v2 は遊走能を促進することが示唆された。大腸癌では線維芽細
16 胞で FBLN2 のスプライシング変化が誘導され、遊走能抑制的に働く v1 の発現を減
17 少させ、遊走能促進的に働く v2 の発現を増加させている可能性が示唆される。この

- 1 *FBLN2* のスプライシング変化の調節機構の解明が、大腸癌の転移機構のさらなる理
- 2 解を深めることが期待される。また、癌周囲の線維芽細胞での *FBLN2* のスプライシ
- 3 ング変化を阻害することで、癌の遊走を抑制できる可能性が考えられ、新たな治療タ
- 4 ーゲットとなる可能性が期待される。さらに、v2 の発現比率を Stage II 大腸癌の術
- 5 後補助化学療法の実施決定の際のバイオマーカーとして使用できる可能性も期待さ
- 6 れる。

1 7. 結論

2 本研究では、大腸癌組織で *FBLN2* のスプライシング変化が生じて、v1 の発現割
3 合が減少し、v2 の発現割合が増加することを示した。*FBLN2* のスプライシング変化
4 を RT-qPCR で定量的に検証した報告はこれまでになく、この点は本研究の新規性の
5 ひとつである。また、大腸組織において *FBLN2* は主に間質の線維芽細胞で発現して
6 いることを明らかにした。さらに v1 が大腸癌の遊走に抑制的に、v2 が促進的に働く
7 ことを示した。*FBLN2* の 2 つのスプライシングバリエントの機能を比較解析した報
8 告はこれまでになく、本研究は *FBLN2* が細胞遊走においてバリエント特異的な機能
9 をもつ可能性を示した初めての報告である。

1 **8. 謝辞**

2 稿を終えるにあたり、本研究において御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院

3 医学系研究科外科病態学講座消化器外科学分野教授の海野倫明先生、同分野院内講師

4 の大沼忍先生、助教の唐澤秀明先生、並びに東北大学がん医学コアセンター細胞増殖

5 制御分野教授の中山啓子先生、助教の舟山亮先生に甚大なる謝意を表します。さらに

6 研究を行うにあたりご支援、ご協力をくださいました東北大学大学院医学系研究科外

7 科病態学講座消化器外科学分野、がん医学コアセンター細胞増殖制御分野の皆様に厚

8 く感謝申し上げます。

9. 文献 Reference

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I *et al*. Global cancer statistics 2018:
2 GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers
3 in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018.
- 4 . 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」.
- 5 Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014; **383**:
6 1490-1502.
- 7 Salehiniya H, Pouyesh V, Tarazoj AA *et al*. Colorectal cancer in the world:
8 incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy*
9 2017; **4**.
- 10 Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA *et al*. Colorectal cancer statistics, 2017.
11 *CA Cancer J Clin* 2017; **67**: 177-193.
- 12 Niikura R, Hirata Y, Suzuki N *et al*. Colonoscopy reduces colorectal cancer
13 mortality: A multicenter, long-term, colonoscopy-based cohort study. *PLoS*
14 *One* 2017; **12**: e0185294.
- 15 Climente-Gonzalez H, Porta-Pardo E, Godzik A *et al*. The Functional
16 Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell Rep* 2017; **20**: 2215-2226.
- 17 Liu J, Li H, Shen S *et al*. Alternative splicing events implicated in
18 carcinogenesis and prognosis of colorectal cancer. *J Cancer* 2018; **9**:
19 1754-1764.
- 20 Danan-Gotthold M, Golan-Gerstl R, Eisenberg E *et al*. Identification of
21 recurrent regulated alternative splicing events across human solid tumors.
22 *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: 5130-5144.
- 23 Sebestyen E, Zawisza M, Eyraas E. Detection of recurrent alternative
24 splicing switches in tumor samples reveals novel signatures of cancer.
25 *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: 1345-1356.
- 26 de Vega S, Iwamoto T, Yamada Y. Fibulins: multiple roles in matrix
27 structures and tissue functions. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 1890-1902.
- 28 Obaya AJ, Rua S, Moncada-Pazos A *et al*. The dual role of fibulins in
29 tumorigenesis. *Cancer Lett* 2012; **325**: 132-138.
- 30 Yates B, Braschi B, Gray KA *et al*. Genenames.org: the HGNC and VGNC
31 resources in 2017. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: D619-D625.
- 32 米国国立生物工学情報センター. Entrez Gene.

1 15 Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA *et al.* Epidermal growth
2 factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM
3 molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2570-2580.

4 16 Rao Z, Handford P, Mayhew M *et al.* The structure of a Ca(2+)-binding
5 epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions.
6 *Cell* 1995; **82**: 131-141.

7 17 Sasaki T, Mann K, Wiedemann H *et al.* Dimer model for the microfibrillar
8 protein fibulin-2 and identification of the connecting disulfide bridge. *Embo*
9 *j* 1997; **16**: 3035-3043.

10 18 Timpl R, Sasaki T, Kostka G *et al.* Fibulins: a versatile family of
11 extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 479-489.

12 19 Zhang HY, Chu ML, Pan TC *et al.* Extracellular matrix protein fibulin-2 is
13 expressed in the embryonic endocardial cushion tissue and is a prominent
14 component of valves in adult heart. *Dev Biol* 1995; **167**: 18-26.

15 20 Tsuda T, Wang H, Timpl R *et al.* Fibulin-2 expression marks transformed
16 mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels, and
17 coronary vessels. *Dev Dyn* 2001; **222**: 89-100.

18 21 Olijnyk D, Ibrahim AM, Ferrier RK *et al.* Fibulin-2 is involved in early
19 extracellular matrix development of the outgrowing mouse mammary
20 epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**: 3811-3828.

21 22 Fassler R, Sasaki T, Timpl R *et al.* Differential regulation of fibulin,
22 tenascin-C, and nidogen expression during wound healing of normal and
23 glucocorticoid-treated mice. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 111-116.

24 23 Sicot FX, Tsuda T, Markova D *et al.* Fibulin-2 is dispensable for mouse
25 development and elastic fiber formation. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 1061-1067.

26 24 Baird BN, Schliekelman MJ, Ahn YH *et al.* Fibulin-2 is a driver of
27 malignant progression in lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2013; **8**: e67054.

28 25 Yi CH, Smith DJ, West WW *et al.* Loss of fibulin-2 expression is associated
29 with breast cancer progression. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1535-1545.

30 26 Fontanil T, Rua S, Llamazares M *et al.* Interaction between the
31 ADAMTS-12 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive
32 effects in breast cancer cells. *Oncotarget* 2014; **5**: 1253-1264.

33 27 Law EW, Cheung AK, Kashuba VI *et al.* Anti-angiogenic and
34 tumor-suppressive roles of candidate tumor-suppressor gene, Fibulin-2, in

- nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 2012; **31**: 728-738.
- 28 Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. UICC. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition. Spain: Wiley-Blackwell, 2010.
- 29 Bachem MG, Schneider E, Gross H *et al.* Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; **115**: 421-432.
- 30 Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M *et al.* Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 2005; **128**: 907-921.
- 31 Kobayashi M, Funayama R, Ohnuma S *et al.* Wnt-beta-catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. *Cancer Sci* 2016; **107**: 1776-1784.
- 32 Kim SK, Kim SY, Kim JH *et al.* A nineteen gene-based risk score classifier predicts prognosis of colorectal cancer patients. *Mol Oncol* 2014; **8**: 1653-1666.
- 33 Sasaki T, Wiedemann H, Matzner M *et al.* Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. *J Cell Sci* 1996; **109** (Pt 12): 2895-2904.
- 34 Funayama R, Taniguchi H, Mizuma M *et al.* Protein-arginine deiminase 2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. *Cancer Sci* 2017; **108**: 713-718.
- 35 Luca AC, Mersch S, Deenen R *et al.* Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 2013; **8**: e59689.
- 36 Wiese AH, Auer J, Lassmann S *et al.* Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev* 2007; **31**: 282-295.
- 37 Ponthier JL, Schluepen C, Chen W *et al.* Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1R alternative exon 16. *J Biol Chem* 2006; **281**: 12468-12474.
- 38 Murphy PA, Butty VL, Boutz PL *et al.* Alternative RNA splicing in the endothelium mediated in part by Rbfox2 regulates the arterial response to low flow. *Elife* 2018; **7**.
- 39 Moreno-Layseca P, Streuli CH. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol* 2014; **34**: 144-153.

- 1 40 Faraldo MM, Deugnier M-A, Thiery JP *et al.* Growth defects induced by
2 perturbation of β 1-integrin function in the mammary gland epithelium
3 result from a lack of MAPK activation via the Shc and Akt pathways.
4 *EMBO Reports* 2001; **2**: 431-437.
- 5 41 Stewart RL, O'Connor KL. Clinical significance of the integrin α 6 β 4
6 in human malignancies. *Lab Invest* 2015; **95**: 976-986.
- 7 42 Bianconi D, Unseld M, Prager GW. Integrins in the Spotlight of Cancer. *Int*
8 *J Mol Sci* 2016; **17**.
- 9 43 Zhang H, Shao H, Golubovskaya VM *et al.* Efficacy of focal adhesion kinase
10 inhibition in non-small cell lung cancer with oncogenically activated MAPK
11 pathways. *Br J Cancer* 2016; **115**: 203-211.
- 12 44 Sun Q, Sun F, Wang B *et al.* Interleukin-8 promotes cell migration through
13 integrin α v β 6 upregulation in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2014;
14 **354**: 245-253.
- 15 45 Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell
16 migration--the actin connection. *J Cell Sci* 2009; **122**: 199-206.
- 17 46 Kai F, Laklai H, Weaver VM. Force Matters: Biomechanical Regulation of
18 Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol* 2016; **26**: 486-497.
- 19 47 Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C *et al.* Fibroblast-led collective
20 invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading
21 and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1392-1400.
- 22 48 Sasaki T, Mann K, Murphy G *et al.* Different susceptibilities of fibulin-1
23 and fibulin-2 to cleavage by matrix metalloproteinases and other tissue
24 proteases. *Eur J Biochem* 1996; **240**: 427-434.
- 25

10. 図説

図1. *FBLN2*遺伝子のスプライシングバリエント

(a) *FBLN2*バリエント1 (v1)、バリエント2 (v2)、バリエント3 (v3)のエクソン-イントロン構造を示す。矢印は転写の方向を、矢頭はv1のエクソン9を示す。(b) v1とv2のタンパク質ドメイン構造を示す。v1のカルシウム結合型EGF-like moduleのひとつが、v2ではスプライシングにより除かれる。(c) v1とv2のprimerの設定。左側の矢印はforward primerの位置を、右側の矢印はreverse primerの位置を示す。

8

図2. RNA-seqによる大腸組織の*FBLN2*スプライシングパターンの解析

(a) RNA-seqのデータセット (DRA004011) を用いて*FBLN2* mRNA発現量を解析した。検体は大腸癌患者 (患者1-患者3、表1) の正常部 (N) と癌部 (T) である。白色はv1を、黒色はv2を示す。(b-f) RNA-seqのデータセット (GSE50760) を用いて*FBLN2* mRNAの発現量を解析した。検体は18人の大腸癌患者の正常部 (NC) と癌部 (PC) である。ドットは各サンプルでの値を示す。(b) はv1とv2を合計した全*FBLN2* mRNA量のFPKM値を、(c) と (d) は各バリエントの発現量のFPKM値を、(e) と (f) は全*FBLN2* mRNA量に対する各バリエントの発現の割合を示す。*** $P < 0.001$ (Wilcoxon signed rank test) を表す。n.s.は有意差なし (not significant) の略である。

1

2 図3. RT-qPCRによる大腸組織の*FBLN2*スプライシングパターンの解析

3 (a-e) 7人の大腸癌患者（患者1-患者7、表1）の正常部（N）と癌部（T）の*FBLN2*の
4 発現量を示す。ドットは各サンプルでの値を示す。(a) は*GUSB* mRNA量に対する相
5 対値として算出した*FBLN2* mRNA量の総量を、(b) と (c) はglucuronidase beta
6 (*GUSB*) mRNA量に対する相対値として算出した各バリエーションの発現量を、(d) と
7 (e) は全*FBLN2* mRNA量に対する各バリエーションの発現の割合を示す。*** $P < 0.001$ 、
8 * $P < 0.05$ (Wilcoxon signed rank test) を表す。n.s.は有意差なし (not significant)
9 の略である。

10

11 図4. 大腸組織では*FBLN2*は間質の線維芽細胞で発現している

12 (a-f) 患者1 (a-c) と患者2 (d-f) の組織標本切片における*FBLN2*の免疫組織化学像
13 を示す。(b)、(c)、(e) および (f) に高倍率像を示した。スケールバーは (a) および (d)
14 では300 μm 、(b)、(c)、(e) および (f) では50 μm である。(g) 大腸癌細胞株と初代線
15 維芽細胞株における*FBLN2*のRT-qPCRの解析結果を示す。初代線維芽細胞8、9、10、
16 11はそれぞれ直腸癌患者（患者8、9、10、11、表1）より単離した。(h) 大腸癌細胞

- 1 株と初代線維芽細胞株におけるFBLN2のウェスタンブロッティングの結果を示す。
- 2 内在性コントロールとして β -actinを用いた。

3

4 図5. FBLN2はHT-29とCOLO 205の細胞増殖を抑制する

- 5 (a) FBLN2v1-FLAG (v1) またはFBLN2v2-FLAG (v2) を安定発現する不死化線
- 6 維芽細胞の培養上清の抗 FBLN2 抗体を用いたウェスタンブロッティング。陰性対
- 7 照 (Ctrl) としてFBLN2-FLAGを発現しない不死化線維芽細胞の培養上清を用いた。
- 8 (b) 増殖アッセイの方法。条件培地はv1またはv2を安定に発現する不死化線維芽細胞
- 9 の培養上清から回収し、対照培地はFBLN2-FLAGを発現しない不死化線維芽細胞の
- 10 培養上清から回収した。HT-29、COLO 205、SW620を条件培地または対照培地で7
- 11 日間培養し、Cell Counting Kit-8を用いて大腸癌細胞株の増殖を測定した。(c-e)
- 12 HT-29 (c)、COLO 205 (d)、SW620 (e) での増殖アッセイの結果を示す。結果は平均
- 13 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示した。*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ (two way
- 14 ANOVA followed by Tukey's post-hoc test) を表す。n.s.は有意差なし (not
- 15 significant) の略である。

16

- 17 図6. FBLN2は三次元培養下では大腸癌細胞株の増殖能に影響を与えない

1 (a) マトリゲル増殖アッセイの方法。条件培地と対照培地は図5bと同様に調製した。
2 マトリゲル濃度が33%となるように条件培地とマトリゲルを混合し、37°Cでゲル化さ
3 せた後、ゲル上にHT-29、COLO 205、SW620を播種した。7日間培養した後、写真
4 を撮影し、コロニーの面積を測定した。(b-d) HT-29 (b)、COLO 205 (c)、SW620 (d)
5 におけるマトリゲル増殖アッセイの結果を示す。結果は平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$ 、
6 COLO 205のみ $n = 2$) で示した。いずれの細胞株においても対照培地と条件培地の間
7 で有意差は認めなかった (Tukey-Kramer test)。n.s.は有意差なし (not significant)
8 の略である。

9

10 図7. 大腸癌細胞株の遊走に与えるFBLN2の効果

11 (a) 遊走アッセイの方法。条件培地と対照培地は図5bと同様に調製した。SW620、
12 DLD-1、COLO 205、HCT-8とHT-29を培地で1日培養した。0日目でスクラッチを行
13 なった後に、条件培地と対照培地で2日または3日間培養し、創傷部の面積を測定して、
14 細胞の遊走率を計算した。(b-e) SW620 (b、c) とDLD-1 (d、e) の遊走アッセイの結
15 果を示す。対照培地、v1条件培地またはv2条件培地を用いて3日間培養した。(f-h)
16 COLO 205 (f)、HCT-8 (g) およびHT-29 (h) における遊走アッセイの結果を示す。結

1 果は平均 ± 標準偏差 ($n \geq 3$) で示した。*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、 * $P < 0.05$
2 (Tukey-Kramer test) を表す。n.s.は有意差なし (not significant) の略である。

3

4

5 図8. 大腸癌における *FBLN2* 選択的スプライシングの制御

6 (a) 大腸正常組織と大腸癌組織における *FBLN2* のスプライシングパターンの変化
7 を図示する。青線はv1 mRNAを、赤線はv2 mRNAを示す。 (b) RBFOX2が大腸癌に
8 おける *FBLN2* のスプライシングを制御している仮説。エクソン間の水色の線はイン
9 トロンを示す。v2で除去されるエクソン9のすぐ下流のイントロンにRBFOX2が結合
10 するUGCAUG配列が存在する。RBFOX2がUGCAUG配列に結合するとUGCAUG配
11 列のすぐ上流のエクソンの取り込みが起こる。

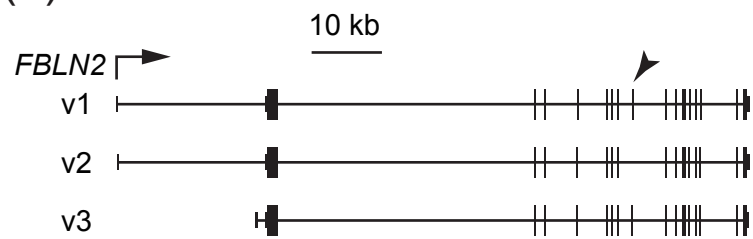
12

13 図9. 大腸癌における *FBLN2* スプライシングバリエーションの機能

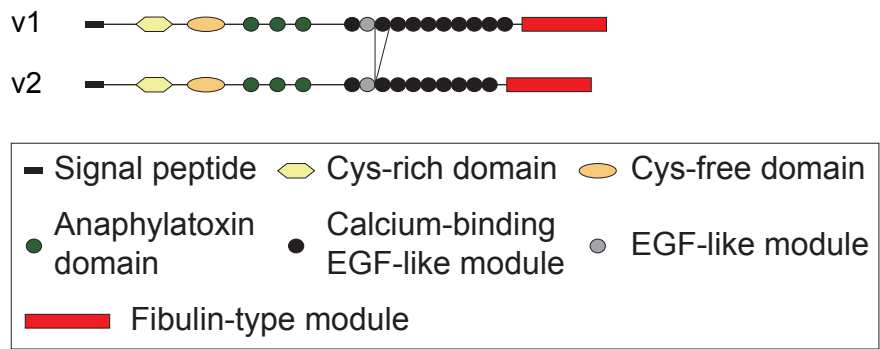
14 (a) *FBLN2* がintegrinシグナルを制御している仮説。Fibronectinがintegrinに結合
15 するとFAKのリン酸化が起こり、PI3K-Akt経路やMAPK経路が活性化される。
16 *FBLN2* はfibronectinと結合することで、integrinシグナルに影響を与えていることが
17 考えられる。 (b) *FBLN2* スプライシングパターンの変化が細胞外マトリックス

- 1 (ECM) をリモデリングしている仮説。v2の方がよりECMを硬くリモデリングするこ
- 2 とで、integrinを介したRho-ROCK経路を活性化して細胞遊走を促進していることが
- 3 考えられる。(c) *FBLN2*スプライシングパターンの変化がMMPに対する感受性を変
- 4 化させる仮説。v2のMMP感受性がv1より高いと、MMPによるECMの分解が起こり
- 5 やすく、細胞の遊走が起こりやすい環境になると考えられる。
- 6

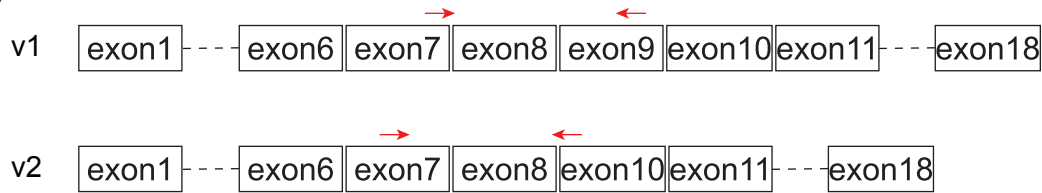
(a)

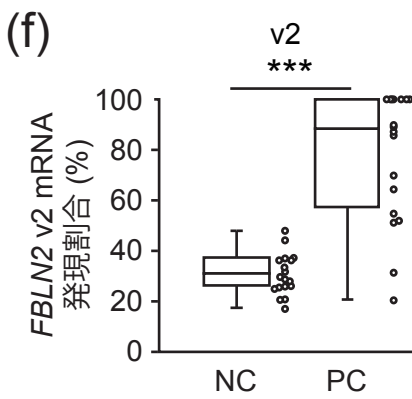
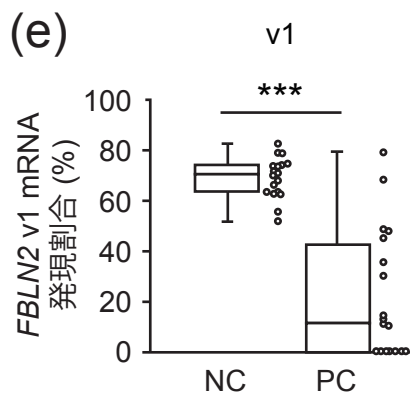
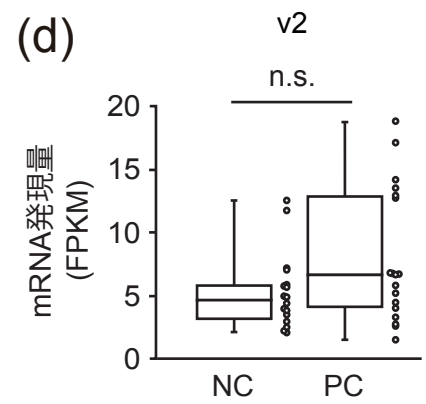
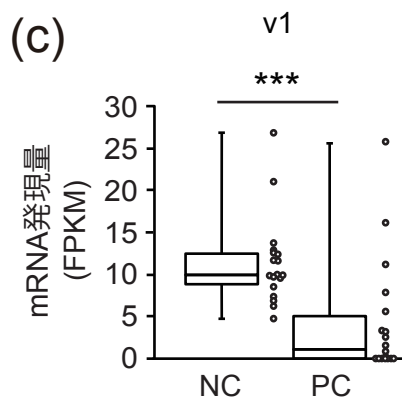
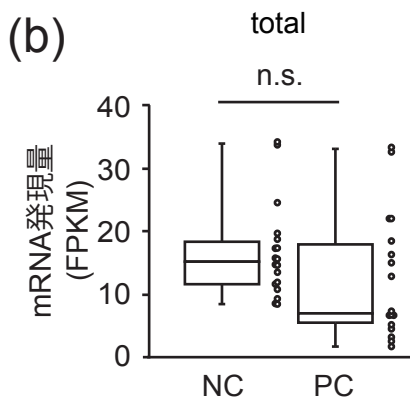
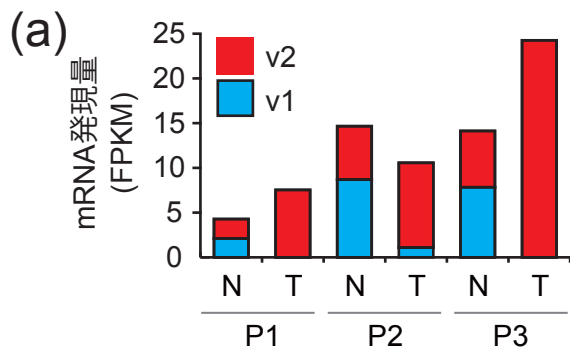


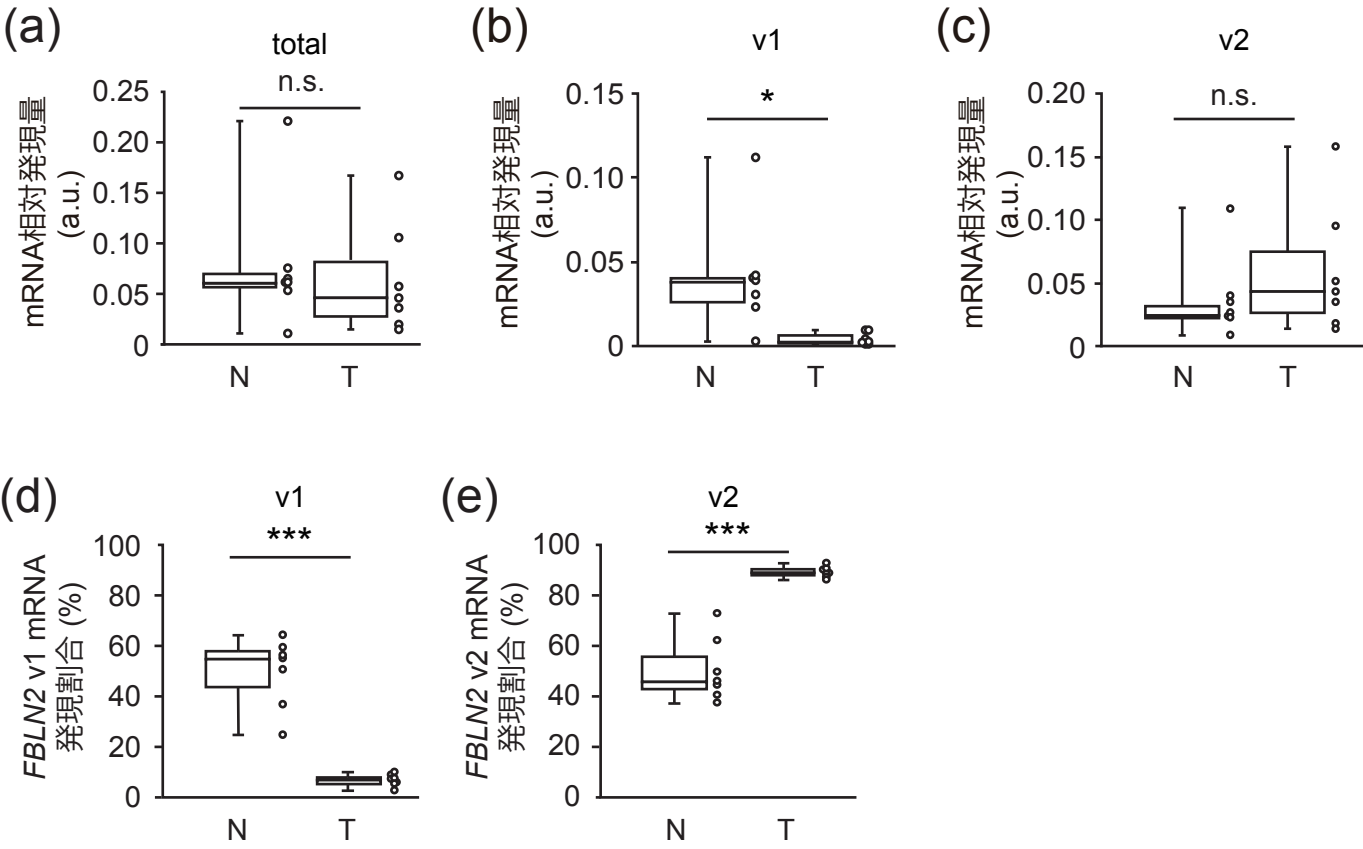
(b)

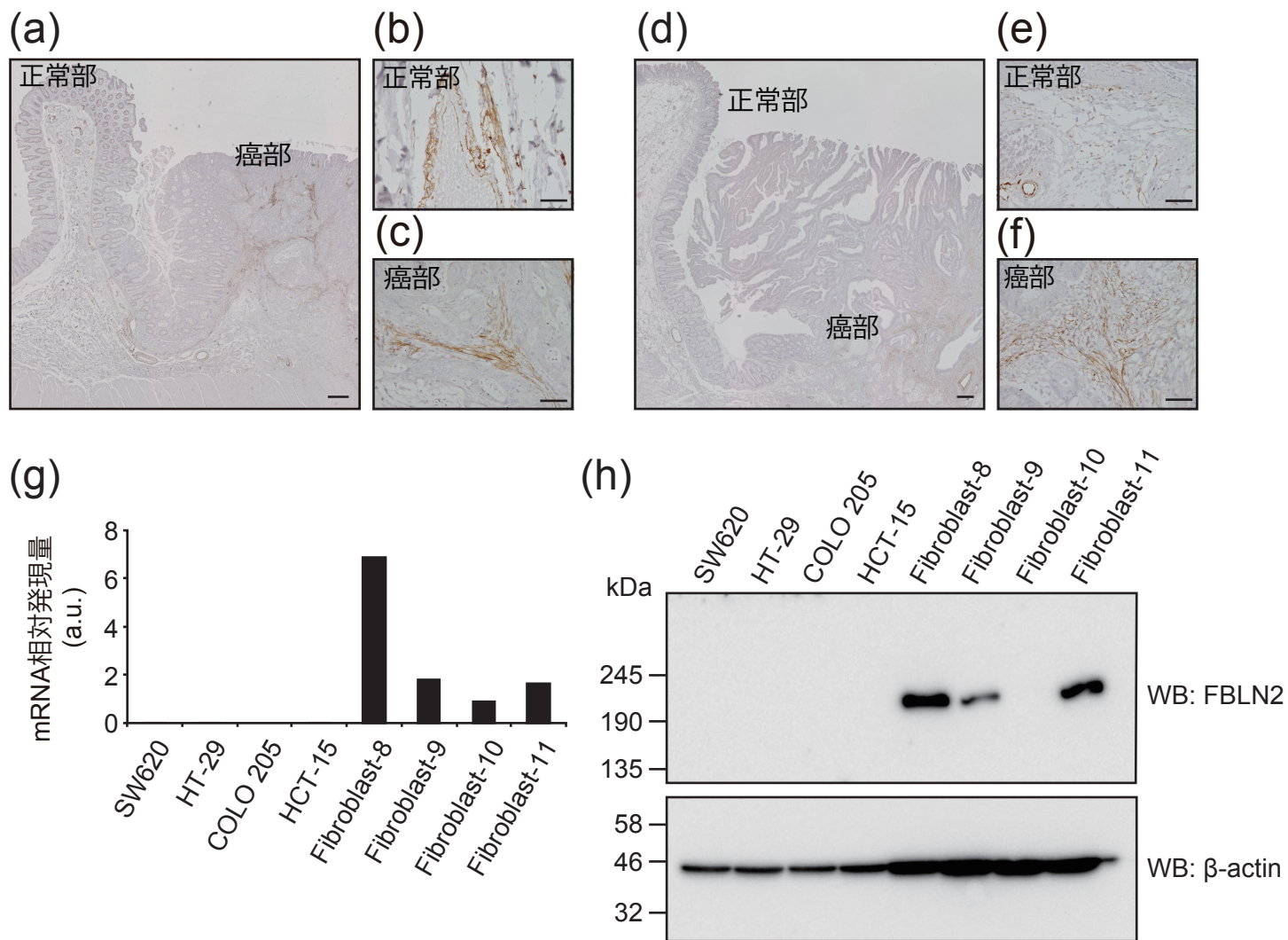


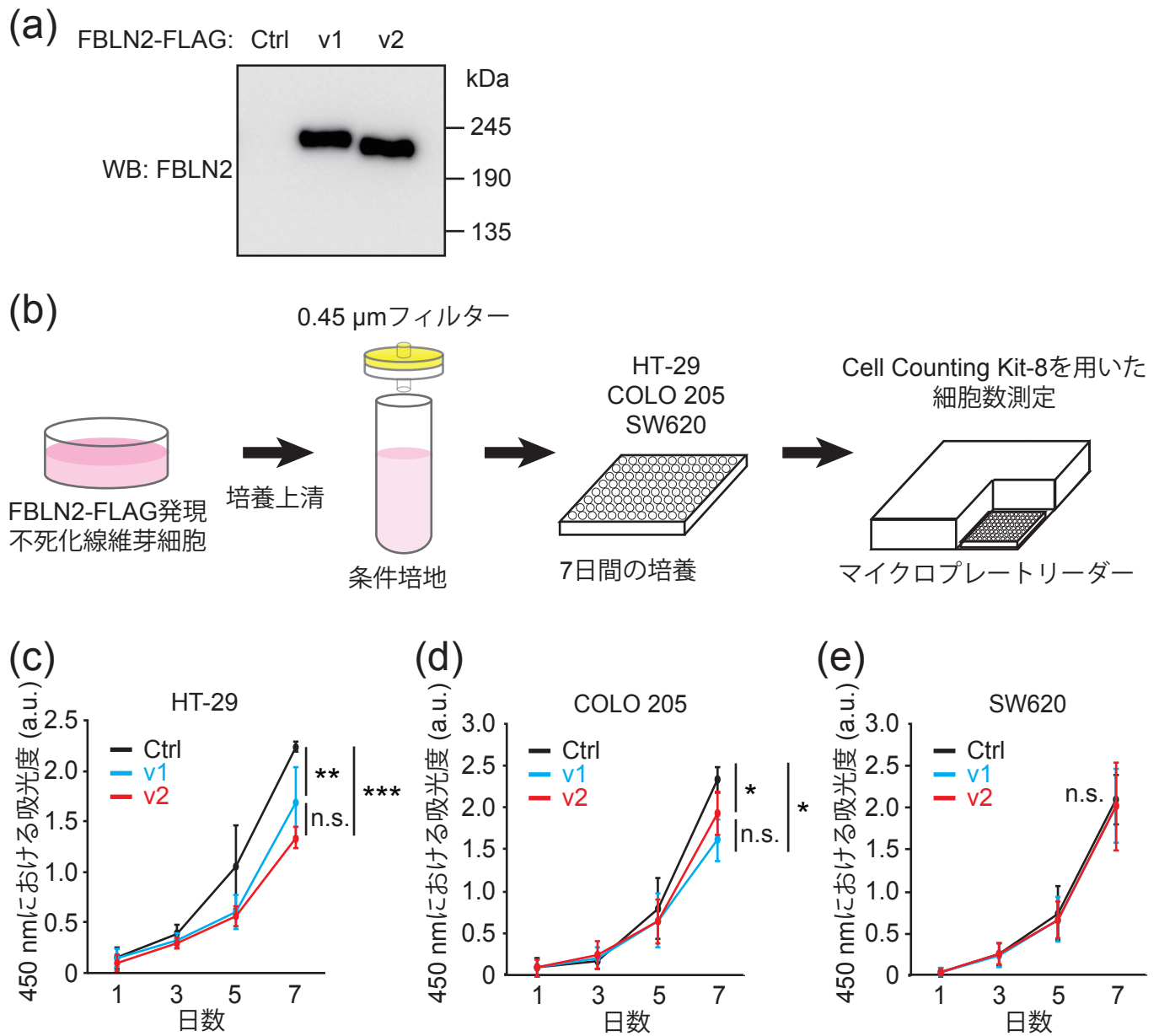
(c)

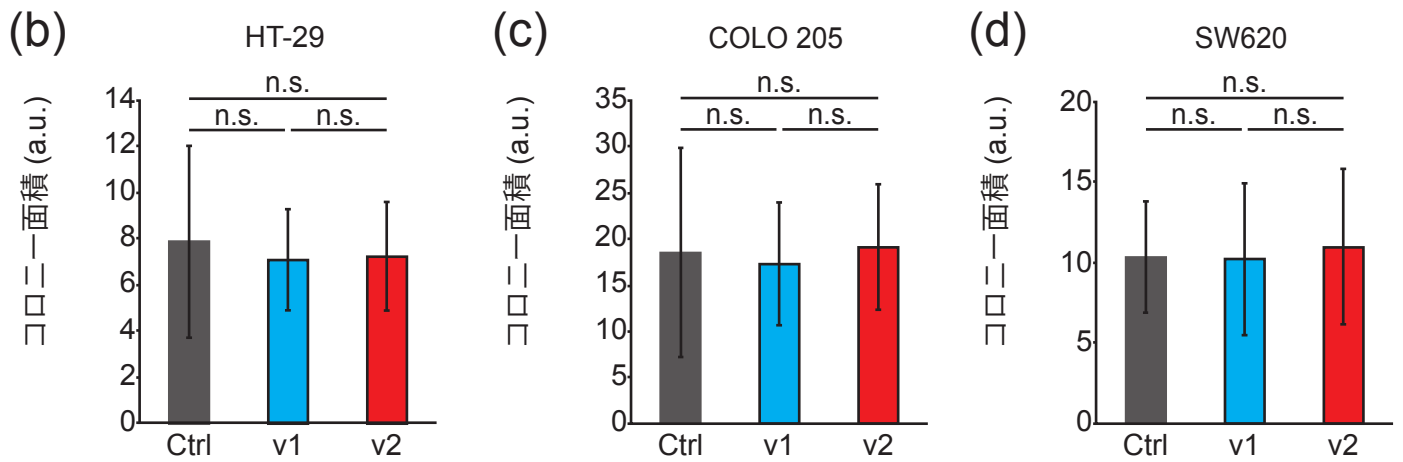
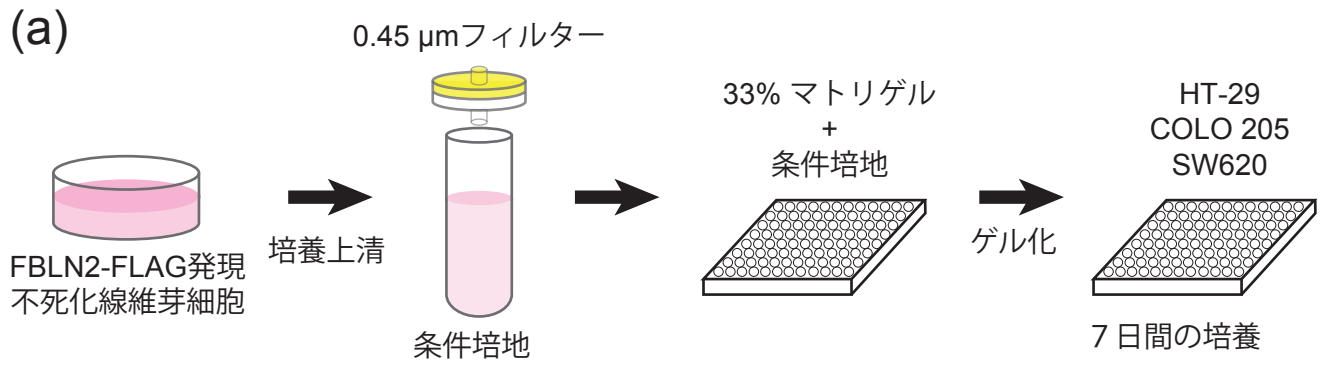


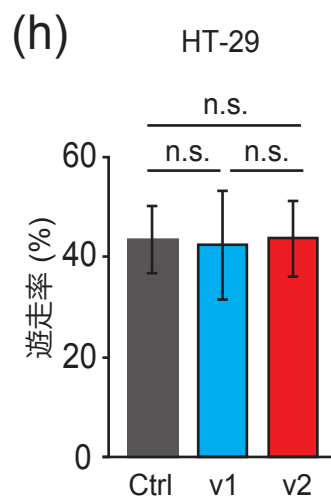
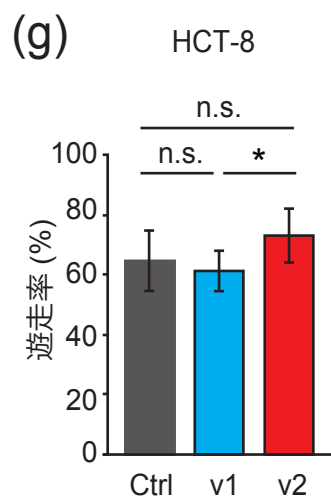
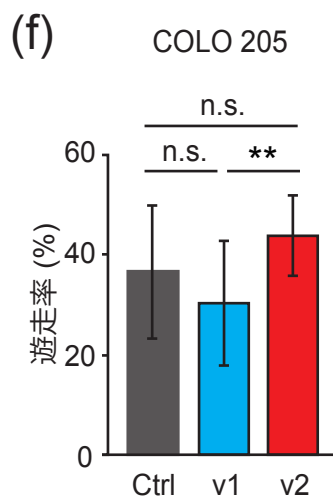
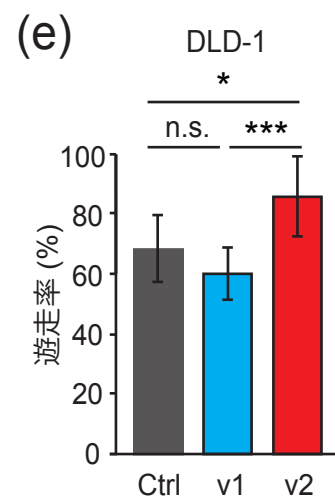
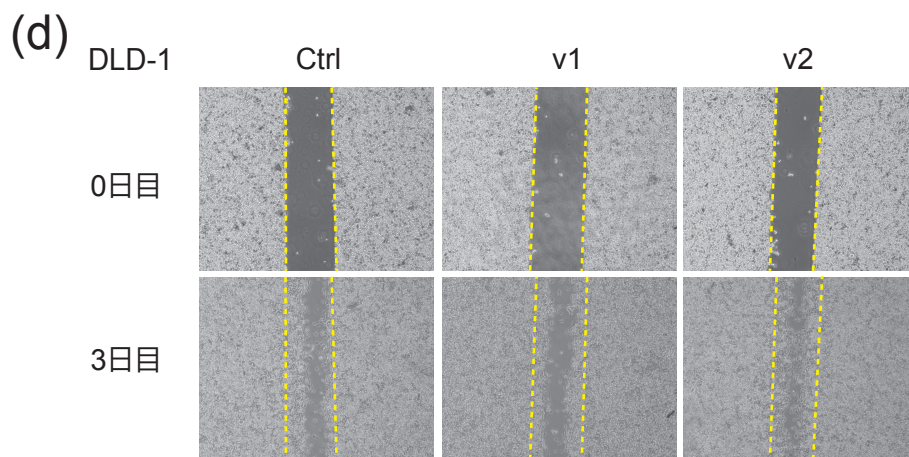
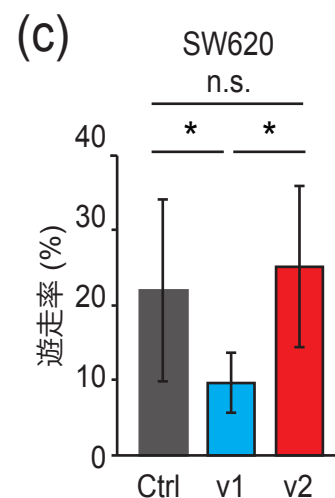
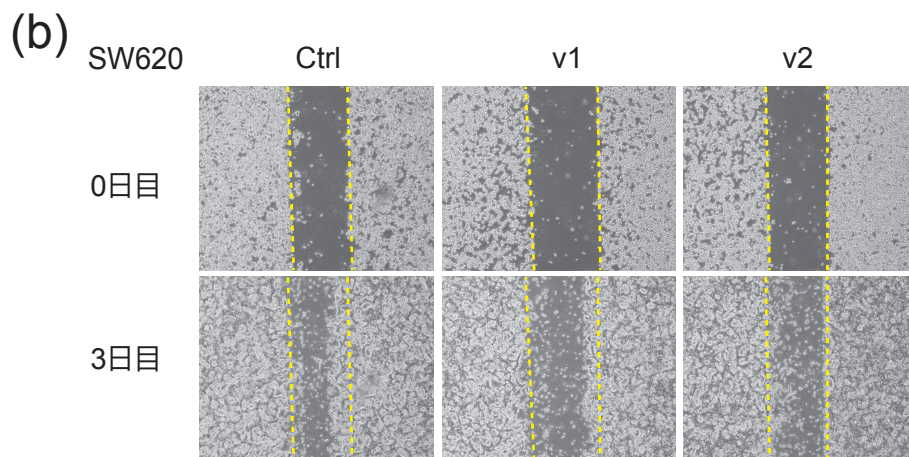
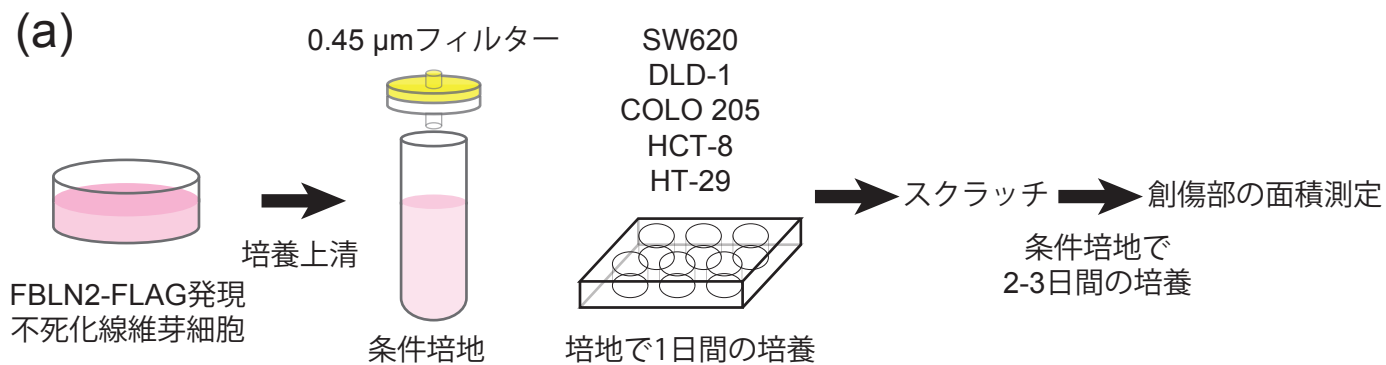




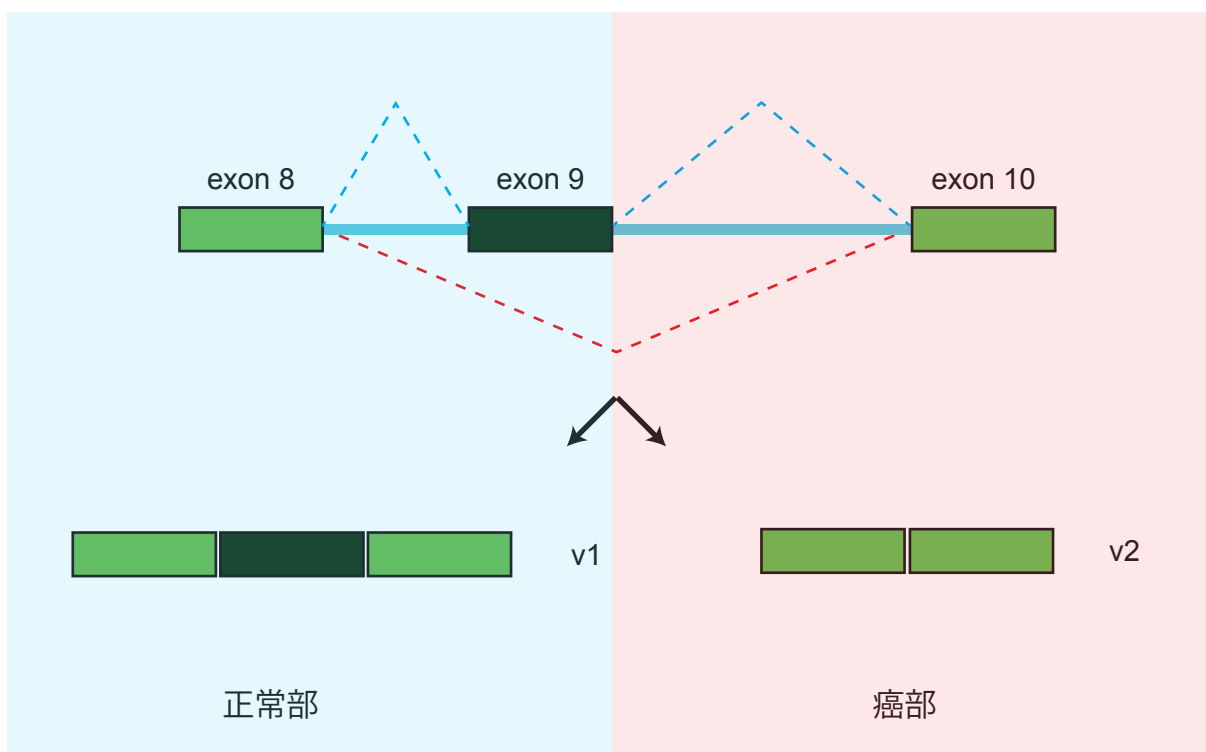




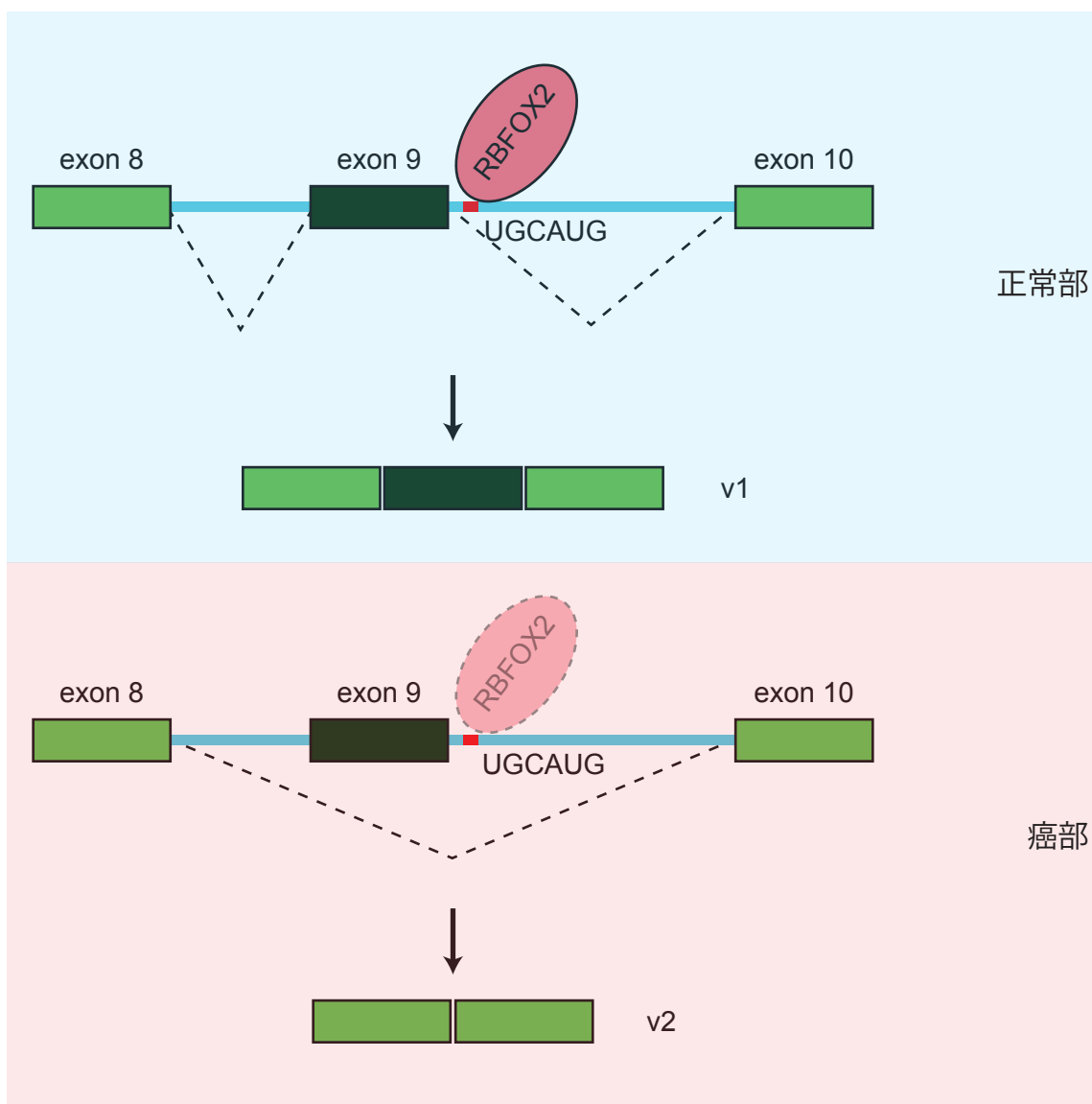


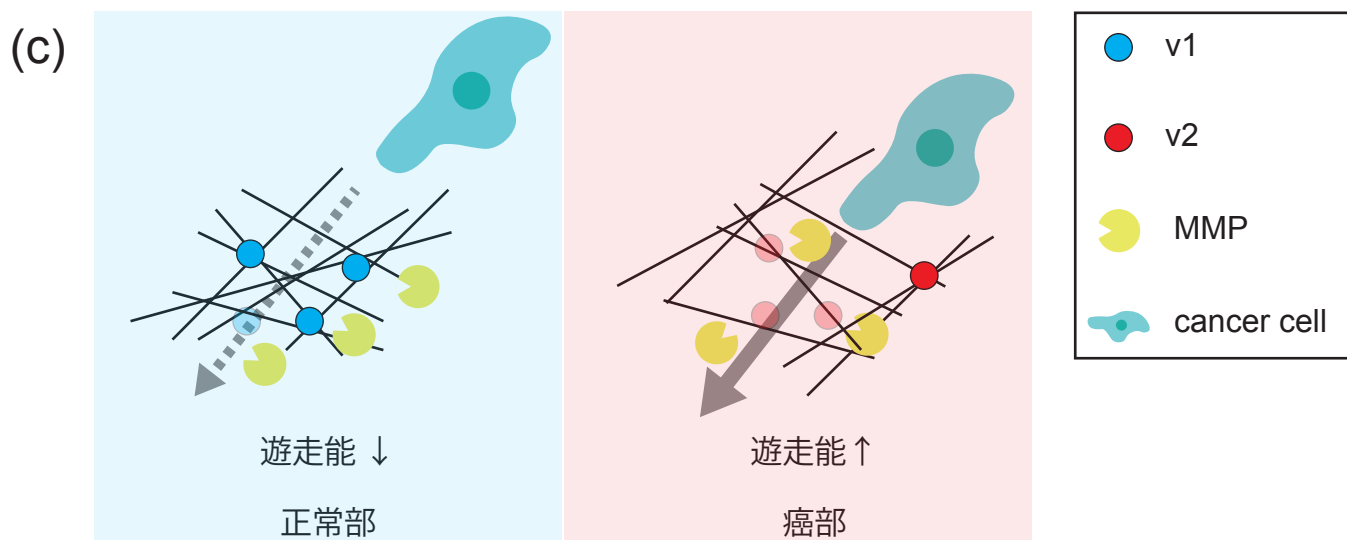
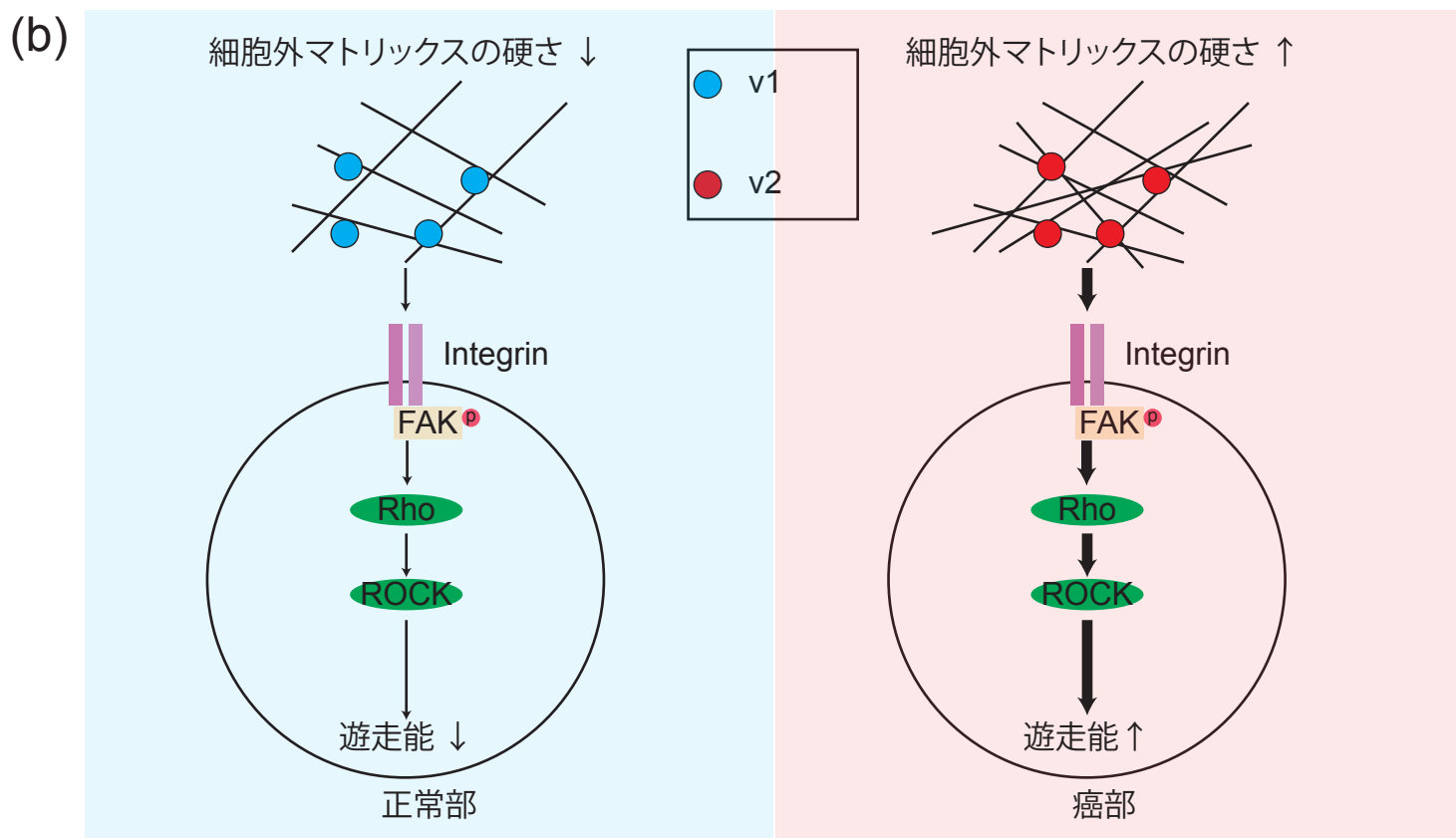
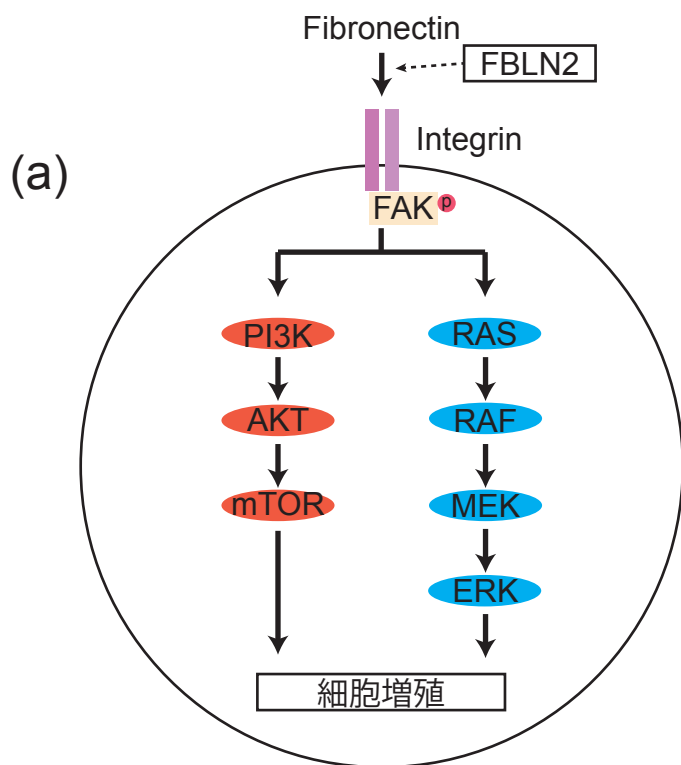


(a)



(b)





12. 表 1. 臨床検体の情報

番号	年齢 (歳)	性別	腫瘍部位	T†	N	M	Stage	合併症	術前治療	RIN‡	
										正常部	癌部
1	69	男性	上行結腸	T3	N1b	M0	IIIB	糖尿病	なし	8.2	7.9
2	61	男性	上行結腸	T3	N0	M0	IIA	なし	なし	9.0	9.0
3	56	女性	S 状結腸	T2	N0	M0	I	なし	なし	7.5	6.9
4	71	女性	上行結腸	T3	N0	M1a	IVA	関節リウマチ	なし	5.7	6.6
5	61	女性	直腸	T3	N1b	M0	IIIB	潰瘍性大腸炎	なし	6.4	7.1
6	73	男性	上行結腸	T3	N0	M0	IIA	胃癌	なし	5.9	4.9
7	55	女性	直腸	T2	N1a	M0	IIIA	乳癌	なし	6.7	5.7
8	73	男性	直腸	T3	N1b	M1a	IVA	なし	なし	NT§	NT
9	68	男性	直腸	T3	N1b	M1a	IVA	なし	なし	NT	NT
10	58	女性	直腸	T3	N2b	M0	IIIC	なし	なし	NT	NT
11	61	男性	直腸	T4a	N2a	M1a	IVA	なし	なし	NT	NT
12	58	男性	胃	T4a	N3b	M1	IV	胸腺腫	なし	NT	NT

†TNM 分類（第 7 版）に基づいて、検体の T（原発腫瘍の深達度）、N（リンパ節転移の有無とその個数）、M（遠隔転移の有無）を示す。

‡RIN; 抽出した total RNA の RNA integrity number (RIN) 値を示す。§NT; not tested.